

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 5 6 3 号	学位授与年月日	平成 22 年 3 月 15 日
氏 名	天 野 慎 士		
論文題目	Use of genetically engineered bone marrow-derived mesenchymal stem cells for glioma gene therapy (遺伝子導入骨髄間葉系幹細胞を用いた神経膠腫に対する遺伝子治療)		

博士(医学) 天 野 慎 士

論文題目

Use of genetically engineered bone marrow-derived mesenchymal stem cells for glioma gene therapy

(遺伝子導入骨髄間葉系幹細胞を用いた神経腫瘍に対する遺伝子治療)

論文の内容の要旨

[はじめに]

悪性神経腫瘍の治療成績は、近年の治療技術の発達にもかかわらず、過去 30 年間ほとんど改善されていない。最も悪性の膠芽腫では現在も多くの患者が約 1 年で命を落としており、新たな治療法の開発が切望されている。1990 年代に単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (HSVtk) 遺伝子を腫瘍細胞へ導入させた後、抗ウイルス剤であるガンシクロビル (GCV) を全身投与する遺伝子治療が開発された。遺伝子治療では遺伝子導入効率が常に問題になるが、HSVtk/GCV 遺伝子治療では遺伝子非導入細胞に対しても殺細胞効果がおよぶバイスタンダー効果と呼ばれる現象が起こることが分かり注目をあびた。欧米ではレトロウイルスを用いて腫瘍細胞に直接遺伝子導入を行う方法にて第3相臨床試験まで進められたが、この方法では脳内を浸潤性に広がる神経腫瘍を根治させることは困難であった。我々の研究室ではこれまで、腫瘍へ向けての遊走能が知られている神経幹細胞 (NSC) に遺伝子導入を行い、バイスタンダー効果を利用して抗腫瘍効果を発現させるモデルの動物実験を行い、良好な結果を得てきた。しかしながら成人において十分量の NSC を得ることは容易でない。近年、成人骨髄から得られる間葉系幹細胞(MSC)にも NSC 同様の腫瘍集積性があることが分かってきた。本研究では、採取が容易でより臨床応用に適している MSC を用いた HSVtk/GCV 遺伝子治療の効果について検討を行った。

[材料ならびに方法]

1. HSVtk 遺伝子導入 MSC (MSCtk)の作製

Sprague-Dawley (SD) ラットの下肢長管骨より MSC を採取し、専用培養液にて培養を行った。HSVtk 遺伝子の導入は、マウスの繊維芽細胞に HSVtk 遺伝子を組み込んだレトロウイルス産生細胞である PA317 を用いて行った。その後、G418 にて選別した細胞 (MSCtk) を以下の実験に用いた。

2. In vitro バイスタンダー効果

MSCtk とラット神経膠芽腫細胞 C6 を様々な比率で混合し培養した(細胞数 5×10^3 、MSCtk/C6 比を 1/1～1/128)。最初の 7 日間は GCV 存在下 (1 $\mu\text{g/ml}$) で培養、その後は通常の培養を行い、7 日目、14 日目の細胞数を計測した。また、GFP ラットより採取、遺伝子導入した GFP-MSCtk を用い、培養顕微鏡にてリアルタイムにバイスタンダー効果の様子を観察した。

3. In vivo 脳腫瘍治療実験

体重約 300 g の SD ラット脳内に C6 細胞 (1×10^5) を移植した。この脳腫瘍モデルでは全例約 3 週間で腫瘍死する。その 3 日後に MSCtk (1×10^5) を腫瘍部に注入し、その翌日より 7 日間 GCV (30 mg/kg/day) または生理的食塩水の腹腔内投与を行った。腫瘍移植より 20 日目に脳を摘出し、組織学的に検討を行った(各群 n=6)。別の動物で生存期間を調査した(n=6)。

[結果]

1. In vitro バイスタンダー効果

MSCtk/C6 比が 1/1～1/32 までは完全な腫瘍死滅効果が得られた。1/64 および 1/128 でも有意な腫瘍増殖抑制効果が見られた。 $(p<0.001)$ 培養顕微鏡を用いた実験では、腫瘍細胞が MSCtk に接した時に死滅していくバイスタンダー効果の様子をリアルタイムに観察できた。MSCtk は GCV 存在下でも 48 時間以上生存し、バイスタンダー効果が続いていた。

2. In vivo 脳腫瘍治療実験

MSCtk の腫瘍内注入と GCV の全身投与を行った群では、生食投与群に比し腫瘍の大きさは有意に縮小していた $(94.6 \pm 31.89(\text{SD}) \text{ vs. } 1.8 \pm 0.6\text{mm}^3)$ ($p<0.001$)。生存期間も有意に延長し $(21.0 \pm 1.9(\text{SD}) \text{ vs. } 61.3 \pm 38.4 \text{ 日})$ ($p<0.003$)、6 例中 2 例で 100 日以上生存し治癒したものと考えられた。

[考察]

In vitro バイスタンダー効果は、MSCtk/C6 比が 1/32 まで完全な腫瘍死滅効果が得られ、NSC での実験と比べても遜色なかった。また、培養顕微鏡を用いた観察では、最初は C6 細胞が増殖していったが、MSCtk と接した腫瘍細胞はバイスタンダー効果により死滅していった。MSCtk は 48 時間以上生存し、バイスタンダー効果が続いた。バイスタンダー効果は、細胞分裂時に起こるので、分裂能の低い MSCtk は長期間生存したと考えられる。

In vivo 脳腫瘍治療実験では、明らかな脳腫瘍の縮小と生存曲線の延長が見られた。この効果も NSC と比べ遜色なかった。MSCtk と腫瘍細胞の比率により効果が変わるので、MSCtk の投与量を考慮する必要がある。MSCtk 投与後は早めに GCV を開始する方が効果的と考えられた。

悪性神経膠腫の再発は正常脳組織に浸潤した腫瘍周辺の細胞から起こってくる。腫瘍細胞に直接遺伝子導入を行う HSVtk/GCV 自殺遺伝子ではこの部分が治療できなかったと思われる。腫瘍集積性のある NSC や MSC をベクターとして用いれば、問題となってくる浸潤部にも充分に行き渡り、バイスタンダー効果により抗腫瘍効果が得られると考えられた。また NSC よりも MSC の方が採取も容易で、より臨床応用に近いと考えられた。

[結論]

MSC を用いた HSVtk/GCV 自殺遺伝子治療は、NSC を用いた場合とほぼ同等の効果がある。MSC の採取がより容易であることを考慮すると臨床応用に適した方法と考えられた。

論文審査の結果の要旨

神経膠腫は周囲の正常組織に浸潤するため、根治的手術が困難である。その中でも神経膠芽腫の平均生存期間は 1 年に過ぎないことから、新規治療法の開発が望まれてきた。申請者が所属する研究室では単純ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼ (HSVtk) と抗ウイルス剤ガンシクロビル (GCV) の併用によって生じる bystander 効果を利用した自殺遺伝子治療の研究を行ってきた。Bystander 効果とは HSVtk によって生成された GCV 代謝産物が細胞接着装置などを介して、隣接する腫瘍細胞に拡散し、細胞分裂の際に細胞死を引き起こすことで抗腫瘍効果を発揮する現象である。しかし、従来のウイルスなどを用いた遺伝子導入法では浸潤性に広がる神経膠腫の

すべてを治療範囲に収めることができず、根治につながらないことがわかっている。

そこで、申請者は腫瘍を追跡する能力があることが知られている骨髄由来 mesenchymal stem cells (MSC) に HSVtk 遺伝子を導入した MSCtk から生じる bystander 効果の検討を行った。In vitro では、MSCtk と神経膠腫細胞を GCV 存在下で共培養すると、MSCtk に対する細胞毒性は低いが腫瘍細胞の増殖が抑制されること ($p<0.01$) を明らかにした。In vivo では、ラット脳に作製した神経膠腫腫瘍に直接注入された MSCtk が腫瘍全体に移動するだけでなく腫瘍浸潤部にも移動すること、腫瘍径を縮小させること ($p<0.01$) 及び生存期間を延長させること ($p<0.01$) を明らかにした。

Neural stem cells を HSVtk のベクターとして用いた研究で同様の結果を得ているが、採取がより容易な骨髄由来 MSC を HSVtk のベクターとして用いることに申請者の研究の新規性と有用性があるものと考えられた。申請者の研究は、自殺遺伝子治療を臨床応用可能にするものとして高く評価された。

以上により、本論文は博士(医学)の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	岩下 寿秀		
	副査	大西 一功	副査	宮嶋 裕明